

EFICACIA DE UN HERPESVIRUS DE PAVO RECOMBINANTE EXPRESANDO LA PROTEÍNA VP2 DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE GUMBORO ANTE UN DESAFÍO EXPERIMENTAL

Efficacy of a Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing the Viral Protein 2 of the Gumboro Disease Virus Against an Experimental Challenge

Francisco Perozo¹, Pedro Villegas², Yaneth Mavárez¹, Rafael Fernández³ y Julio Cruz³

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Apartado 15252. Maracaibo 4005-A Estado Zulia, Venezuela.

E-mail: frankperozo1@latinmail.com - perozofrancisco@gmail.com. ² Poultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA, USA. ³ Merial Select, Inc. Gainesville, GA, USA.

RESUMEN

La vacunación temprana contra el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (por sus siglas en inglés IBDV) es una práctica muy común; sin embargo, el uso de vacunas de baja atenuación puede comprometer la integridad de la bolsa de Fabricio en aves jóvenes generando inmunosupresión y el fracaso de los planes de vacunación. Una alternativa es la utilización de vectores virales para la expresión transgénica de proteínas inmunogénicas que pueden proporcionar protección adecuada sin el potencial daño a la bolsa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la protección contra un desafío experimental con cepas clásicas conferida por la vacunación al día de edad con VAXXITEK[®], un herpesvirus de pavo (por sus siglas en inglés HVT) expresando la proteína inmunogénica VP2 de una cepa clásica del IBDV. Aves libres de patógenos específicos fueron vacunadas al día de edad por la vía subcutánea y luego desafiadas a los 18 ó 28 días de edad con la cepa STC del virus de la enfermedad de Gumboro. El criterio de protección incluyó signos clínicos, índice peso bolsa/peso corporal y la histopatología de la bolsa. En las aves vacunadas con VAXXITEK[®], no se observaron signos clínicos o lesiones asociadas al desafío con la cepa STC, ni en el desafío temprano ni en el tardío. El índice bursal resultó significativamente menor en las aves no vacunadas que fueron desafiadas. Estos resultados indican que una dosis de la vacuna HVT-IBDV recombinante protege a las aves contra un desafío con cepas clásicas.

® VAXXITEK es una marca registrada de Merial en los Estados Unidos y en el resto del mundo.

Palabras clave: Virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, HVT recombinante, protección.

ABSTRACT

Early vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) is a common practice; however, the use of live attenuated vaccines may sometimes compromise the bursal integrity in young birds generating immunosuppression and failures in vaccination programs. An alternative is the use of viral vectors for transgenic expression of immunogenic proteins that can provide adequate protection without the potential bursal damage. The objective of this work was to assess the protection against a classical strain challenge conferred by day-one vaccination using VAXXITEK[®], a recombinant herpesvirus of turkey expressing the immunogenic viral protein 2 from a classical IBDV. Specific pathogen free (SPF) one-day old birds were vaccinated by the subcutaneous route and challenged with the STC IBDV strain at 18 or 28 days of age. The protection criteria included: clinical signs, bursa/bodyweight ratio and bursal histopathology. No clinical signs or STC challenge related bursal lesions were observed in the VAXXITEK[®] vaccinated birds at both early and late challenge. The bursal index was significantly lower in the unvaccinated challenged birds. These results indicate that single dose recombinant HVT-IBDV vaccination protects chickens against a classical strain challenge.

® VAXXITEK is a registered trademark of Merial in the United States of America and elsewhere.

Key words: Infectious bursal disease virus, HVT, protection.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad infecciosa de la bolsa (por sus siglas en inglés IBD) es una enfermedad viral aguda y contagiosa que afecta a los pollos (*Gallus gallus*) jóvenes, caracterizada por

inflamación seguida de atrofia de la bolsa de Fabricio y por grados variables de inmunosupresión. Las manifestaciones clínicas dependen de la virulencia y la dosis del inóculo, de la edad y raza de las aves y de la presencia o ausencia de inmunidad pasiva [20]. La patología es causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (por sus siglas en inglés IBDV) [15]. La proteína VP2 es el componente principal de la cápsula del virus, en la misma están presentes epítopes dependientes de su conformación que inducen anticuerpos neutralizantes [2].

La importancia económica de la enfermedad se manifiesta de dos formas: la alta mortalidad que pueden causar algunas cepas del virus, donde las pérdidas económicas son usualmente resultado de una alta mortalidad y pobre conversión de alimentos [11, 13]. Mientras la segunda, es la forma subclínica de la enfermedad, la cual se presenta en pollos menores de tres semanas de edad y provoca una marcada inmunosupresión, por destruir las células linfoides inmaduras en la bolsa de Fabricio [21, 23].

El control de la IBD y de la inmunosupresión asociada con la misma es crítico para la industria avícola, en la actualidad este control se intenta mediante protección pasiva de la progenie por hiperinmunización de las madres con vacunas vivas e inactivadas y/o mediante el uso de vacunas vivas del virus de la enfermedad de Gumboro en pollos, ponedoras o pollonas jóvenes, para proporcionar protección activa contra la enfermedad [15]. Alternativamente, la utilización de la biotecnología en el control de las enfermedades infecciosas ha permitido el uso de vectores virales, expresión transgénica de proteínas para vacunación de subunidades y la utilización de ácido desoxirribonucleico (ADN) del patógeno como fuente antigénica en el proceso de inmunización [16]. Algunos ejemplos para el control de la enfermedad de Gumboro incluyen: proteína VP2 expresada en levaduras [17], en el sistema baculovirus [7] y vacunas recombinantes del virus de la enfermedad de Newcastle [14].

Aunque la manipulación genética de los virus puede producir una atenuación en los mismos, mejorando su calidad como vacunas, la interferencia de los anticuerpos maternos en el momento de la inmunización es aún un factor a considerar [1]. Los virus recombinantes están genéticamente modificados para expresar además de las proteínas estructurales propias del virus, proteínas antigénicas de interés como es el caso de la proteína viral 2 (VP2) del IBDV. Estas vacunas son seguras debido a que no existe el riesgo de reversión a virulencia y a que las proteínas transgénicas producidas son menos susceptibles a la inactivación por los anticuerpos maternos anti-IBDV. Para el control de la IBD ya se encuentran en el mercado o están en etapa experimental, productos recombinantes basados en el virus de viruela aviar [4], en el herpesvirus de pavo [5, 6, 24], en el virus adenoasociado aviar [16] y en el adenovirus [22].

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la protección contra un desafío experimental con cepas clásicas conferida por la vacunación al día de edad con VAXXITEK®, un

HVT expresando la proteína inmunogénica VP2 de una cepa clásica del IBDV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Para el experimento se utilizó un total de 120 aves libres de patógenos específicos de un día de edad. Las aves se dividieron en seis grupos de 20 aves, las cuales fueron alojadas en unidades de aislamiento (FIG 1), dos grupos fueron vacunados al día 1 por vía subcutánea con 0,2 mL contentivos de $3,0 \log_{10}$ unidades formadoras de colonia de la cepa recombinante vHVT013-19 (VAXXITEK®) [6]. A los 18 días se realizó un primer desafío (temprano). Un grupo vacunado y uno sin vacunar fueron desafiados por vía ocular con 0,1 mL de la cepa estándar de desafío STC (10^4 dosis infectiva 50/mL.), un tercer grupo fue utilizado como control no desafiado. A los 28 días se realizó un segundo desafío (tardío) siguiendo el mismo protocolo. El criterio de protección incluyó signos clínicos, índice peso bolsa/peso corporal y la histopatología de la bolsa.

Toma de muestras

Cuatro días posteriores a cada desafío se determinó el peso de las aves que luego fueron sacrificadas por dislocación cervical. Para cada ave se determinó el peso de la bolsa de Fabricio. Las bolsas fueron seccionadas a la mitad, una sección fue sumergida en formalina buferada al 10%, durante 24 horas y procesadas siguiendo los procedimientos rutinarios para la preparación de tejidos [10]. Adicionalmente, se calculó la relación entre el peso de la bolsa y el peso corporal de cada ave (índice de bolsa) mediante la fórmula peso bolsa / peso corporal x 1000.

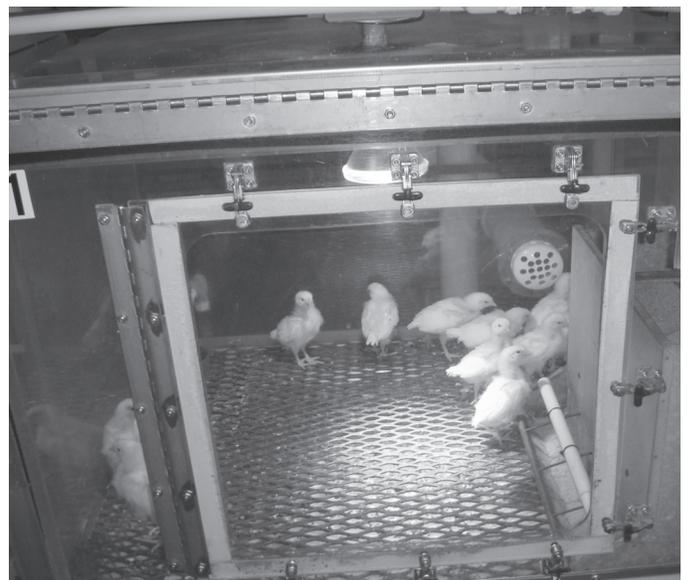


FIGURA 1. UNIDADES DE AISLAMIENTO Y AVES UTILIZADAS EN EL EXPERIMENTO / ISOLATION UNITS AND BIRDS USED IN THE EXPERIMENT.

Evaluación microscópica de la bolsa

La evaluación histopatológica proporcionó una gradación de las bolsas de Fabricio según la escala ordinal reportada por Henry y col. [12], el rango se describe a continuación: grado 0, bolsa normal; grado 1: folículos aislados con necrosis leve; grado 2: depleción linfoide moderada y generalizada o folículos aislados con depleción linfoide severa; grado 3: depleción linfoide severa en más del 50% de los folículos; grado 4: folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues.

Análisis estadístico

Los datos fueron registrados en una hoja de cálculo del programa Windows Excel. Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico Sigma Stat 3,0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Para la comparación de medias se aplicó el método Student-Newman, Keuls (SNK). La significancia de los procedimientos estadísticos fue de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas clásicas del IBDV afectan a las aves a partir de las tres semanas de edad [15], sin embargo, la reutilización de cama y la persistencia del virus en el ambiente [25] hacen posible el contacto muy temprano de las aves con cargas virales altas, por lo que este experimento se diseñó para evaluar en conjunto el efecto de un desafío temprano (18 días), así como la persistencia de la protección conferida por una dosis de VAXXITEK® al día de edad en el marco de un desafío tardío (28 días).

El presente ensayo demostró que el HVT recombinante confiere protección completa contra un desafío experimental.

En las aves vacunadas con VAXXITEK® y desafiadas a los 18 ó 28 días de edad, no se observaron signos clínicos post-desafío, sugiriendo una adecuada protección contra los efectos del virus de desafío. Por el contrario, los controles no vacunados-desafiados, mostraron sintomatología clínica de la enfermedad (depresión severa y plumas erizadas) e incluso un 20% de mortalidad cuatro días post-desafío. Las lesiones macroscópicas incluían bursitis hemorrágica severa y edema marcado de la bolsa. En la FIG. 2, se muestra el efecto del virus de desafío sobre un control no vacunado. El nivel de protección observado en el experimento fue equivalente al reportado previamente para vacunas HVT recombinantes expresando proteínas antigénicas del IBDV en aves desafiadas con cepas clásicas del virus de Gumboro, donde aves vacunadas con una dosis del virus recombinante mostraron niveles óptimos de protección [5, 24].

Los resultados del índice bursal y el registro de lesiones histopatológicas para los animales desafiados a los 18 días, pueden observarse en las FIGS. 3A y 3B. El índice de la bolsa muestra la relación entre el peso de la bolsa y el peso del ave, el mismo ha sido utilizado anteriormente como un indicador de inmunocompetencia en las aves [8]. En el presente ensayo las aves vacunadas con el HVT recombinante mostraron valores de índice de bolsa significativamente más altos ($P < 0,05$) que las aves no vacunadas-desafiadas, indicando que el virus de desafío no indujo daños tisulares ni involución de la bolsa de Fabricio, sugiriendo protección y una adecuada inmunocompetencia de estas aves a pesar del desafío experimental.

La FIG. 3B muestra un incremento significativo en el registro o valoración de las lesiones de la bolsa de Fabricio de las aves no vacunadas-desafiadas en comparación con las aves vacunadas y los controles no desafiados, indicando pro-

A) Ave vacunada y desafiada (sin lesiones)



B) Control no vacunado (bolsa hemorrágica)



FIGURA 2. EFECTO DEL DESAFÍO EXPERIMENTAL CON CEPA STC A LOS 18 DÍAS DE EDAD EN LA BOLSA DE FABRICIO/ EFFECT OF EXPERIMENTAL CHALLENGE AT 18 DAYS WITH STC STRAIN ON SPF CHICKENS BURSA OF FABRICIOUS.

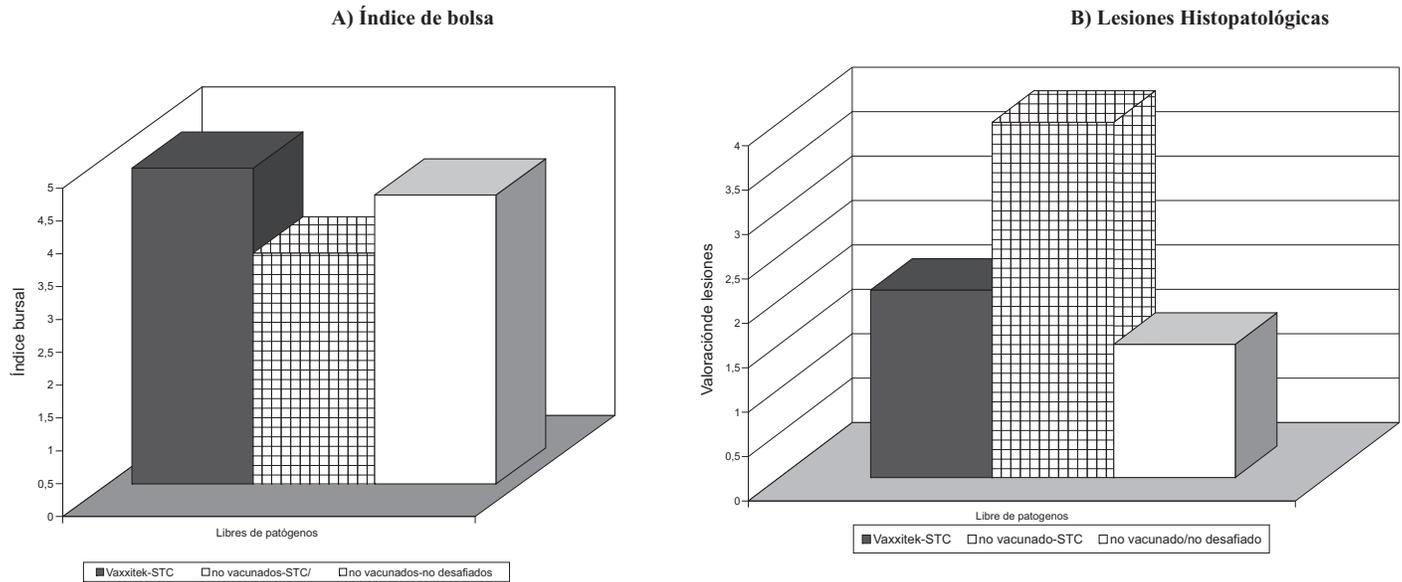


FIGURA 3. ÍNDICE DE BOLSA Y VALORACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN EL DESAFÍO TEMPRANO (18 DÍAS). CUATRO DÍAS POST-DESAFÍO EL ÍNDICE BURSAL FUE MAYOR ($P < 0,05$) Y EL REGISTRO DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS SIGNIFICATIVAMENTE MENOR EN LAS AVES VACUNADAS/ BURSAL INDEX AND HISTOPATHOLOGY SCORES IN EARLY CHALLENGE (18 DAYS). FOUR DAYS POST-CHALLENGE THE BURSAL INDEX WERE HIGHER AND THE HISTOPATHOLOGICAL SCORES SIGNIFICANTLY LOWER IN THE VACCINATED BIRDS.

tección producto de la vacunación. Los controles desafiados presentaron lesiones histopatológicas consistentes con inflamación de la bolsa de origen viral: depleción linfoide severa de los folículos, incremento de la cantidad de estroma entre los folículos y atrofia folicular severa. El nivel de lesiones observadas en la bolsa de Fabricio constituye un indicador del deterioro de la capacidad de respuesta inmune del ave; el órgano blanco de la vacuna HVT recombinante no es la bolsa de Fabricio ni los linfocitos B inmaduros, pues en esencia éste es un herpesvirus al que se le insertó el gen que codifica para la VP2 de la cepa 52/70 Faragher y sigue la patogenia y patrón de replicación viral de los herpesvirus [6]. En consecuencia, no se produce daño tisular atribuible a la vacunación como el observado en las vacunas vivas intermedias e intermedias plus de Gumboro que se replican en las células B inmaduras y ocasionan daño tisular de moderado a severo [19].

Los resultados del índice de la bolsa y el registro de lesiones histopatológicas para el desafío realizado a los 28 días pueden observarse en las FIGS. 4A y 4B. Consistente con los resultados observados en el desafío temprano, la vacunación protegió las aves contra el desafío experimental, el índice peso bolsa/peso corporal fue significativamente mayor y las lesiones histopatológicas post-desafío menores ($P < 0,05$) en las aves vacunadas con VAXXITEK®.

En Venezuela, el virus de Gumboro está presente al menos desde el año 1976, cuando Quiroz y col. [18] realizaron el primer aislamiento en un brote de campo. Todos los subtipos del virus (clásicos, muy virulentos y variantes) están presentes en el país, la tipificación molecular de cepas venezolanas ha

sido reportada utilizando la técnica de análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción [3] y mediante la secuenciación directa de nucleótidos [9]. El control de la enfermedad utilizando vacunas tradicionales no ha sido eficiente, lo que se evidencia por la alta incidencia de Gumboro clínico y subclínico en campo y las fallas observadas en los planes de vacunación contra otras enfermedades endémicas como el Newcastle. La utilización de vectores virales para la expresión transgénica de proteínas inmunogénicas como el aquí evaluado (HVT-IBDV) que pueden proporcionar protección adecuada sin daño inicial a la bolsa, es una alternativa válida para el control de la enfermedad [5, 6, 16].

En general, estos resultados indicaron que una dosis de la vacuna VAXXITEK® fue capaz de proteger aves libres de patógenos específicos contra un desafío con cepas clásicas y que la utilización de éste y otros vectores virales representan el futuro del control de las enfermedades infecciosas de las aves.

CONCLUSIONES

No se observaron signos clínicos post-desafío en las aves vacunadas con VAXXITEK® a los 18 y 28 días de edad.

El índice peso bolsa/peso corporal fue mayor y las lesiones histopatológicas post-desafío fueron menores en las aves vacunadas con VAXXITEK®.

Estos resultados sugieren que una dosis individual de la vacuna HVT-IBDV recombinante protege aves libres de patógenos específicos contra un desafío con cepas clásicas.

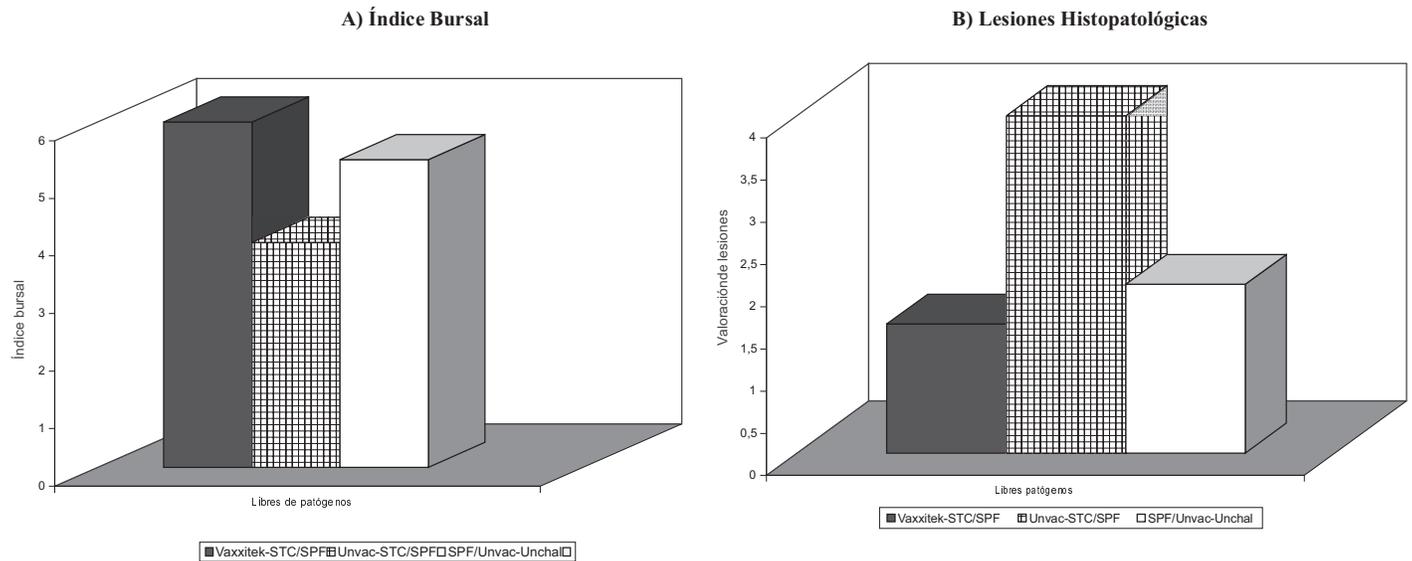


FIGURA 4. ÍNDICE DE BOLSA Y VALORACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN EL DESAFÍO TARDÍO (28 DÍAS). CUATRO DÍAS POST-DESAFÍO EL ÍNDICE BURSAL FUE MAYOR ($P < 0,05$) Y EL REGISTRO DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS SIGNIFICATIVAMENTE MENOR EN LAS AVES VACUNADAS/ BURSAL INDEX AND HISTOPATHOLOGY SCORES IN LATE CHALLENGE (28 DAYS). FOUR DAYS POST-CHALLENGE THE BURSAL INDEX WERE HIGHER AND THE HISTOPATHOLOGICAL SCORES SIGNIFICANTLY LOWER IN THE VACCINATED BIRDS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASHRAF, S.; ABDEL-ALIM, G.; AL-NATOUR, M.Q.; SAIF, Y.M. Interference between mild and pathogenic strains of infectious bursal disease virus in chickens. *Avian Dis.* 49(1):99-103. 2005.
- [2] ASHRAF, S.; ABDEL-ALIM, G.; SAIF, Y.M. Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus by commercial ELISA kits. *Avian Dis.* 50(1):104-109. 2006.
- [3] BANDA, A.; VILLEGAS, P.; EL-ATTRACHE, J. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis.* 47(1):87-95. 2003.
- [4] BAYLISS, C.D.; PETERS, R.W.; COOK, J.K.; REECE, R.L.; HOWES, K.; BINNS, M.M.; BOURSNELL, M.E. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. *Arch. Virol.* 120(3-4):193-205. 1991.
- [5] BUBLLOT, M.; PRITCHARD, N.; LE GROS, F.X.; GOUTEBROZE, S. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J. Comp. Pathol.* 137. Suppl. 1:S81-84. 2007.
- [6] DARTEIL, R.; BUBLLOT, M.; LAPLACE, E.; BOUQUET, J.F.; AUDONNET, J.C.; RIVIERE, M. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* 211(2):481-490. 1995.
- [7] DYBING, J.K.; JACKWOOD, D. J. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. *Avian Dis.* 42(1):80-91. 1998.
- [8] GIAMBRONE, J.J.; CLAY, R.P. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity, and immunosuppressive potential of four commercial live infectious bursal disease vaccines. *Poult. Sci.* 65(7):1287-1290. 1986.
- [9] HAMOUD, M.M.; VILLEGAS, P. Identification of infectious bursal disease viruses from RNA extracted from paraffin-embedded tissue. *Avian Dis.* 50(4):476-482. 2006.
- [10] HAMOUD, M.M.; VILLEGAS, P.; WILLIAMS, S.M. Detection of infectious bursal disease virus from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1):35-42. 2007.
- [11] HASSAN, M.K. Very virulent infectious bursal disease virus in Egypt: epidemiology, isolation and immunogenicity of classic vaccine. *Vet. Res. Commun.* 28(4):347-356. 2004.
- [12] HENRY, C.W.; BREWER, R.N.; EDGAR, S.A.; GRAY, B. W. Studies on infectious bursal disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the bursa of fabricius, thymus, spleen, and kidney in gnotobiotic and battery reared White Leghorns experimentally infected with infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* 59(5):1006-1017. 1980.

- [13] HERNÁNDEZ, M.; BANDA, A.; HERNÁNDEZ, D.; PANZERA, F.; PÉREZ, R. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. **Avian Dis.** 50(4):624-631. 2006.
- [14] HUANG, Z.; ELANKUMARAN, S.; YUNUS, A.S.; SAMAL, S.K. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. **J. Virol.** 78(18):10054-10063. 2004.
- [15] MULLER, H.; ISLAM, M.R.; RAUE, R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. **Vet. Microbiol.** 97(1-2):153-165. 2003.
- [16] PEROZO, F.; VILLEGAS, P.; ESTEVEZ, C.; ALVARADO, I.R.; PURVIS, L.B.; WILLIAMS, S. Protection against infectious bursal disease virulent challenge conferred by a recombinant avian adeno-associated virus vaccine. **Avian Dis.** 52(2):315-319. 2008.
- [17] PITCOVSKI, J.; GUTTER, B.; GALLILI, G.; GOLDWAY, M.; PERELMAN, B.; GROSS, G.; KRISPEL, S.; BARBAKOV, M.; MICHAEL, A. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. **Vaccine.** 21(32):4736-4743. 2003.
- [18] QUIROZ, C.; INFANTE, C. Primer aislamiento en Venezuela del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (Gumboro). **Vet. Trop.** 9 (1): 39 - 46. 1984.
- [19] RAUTENSCHLEIN, S.; KRAEMER, C.; VANMARCKE, J.; MONTIEL, E. Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. **Avian Dis.** 49(2):231-237. 2005.
- [20] RAUW, F.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. Pivotal role of ChIFN γ in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease. **Avian Pathol.** 36(5):367-374. 2007.
- [21] ROSALES, A.G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P.D.; FLETCHER, O.J.; MOHAMED, M.A.; BROWN, J. Pathogenicity of recent isolates of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free chickens: protection conferred by an intermediate vaccine strain. **Avian Dis.** 33(4):729-734. 1989.
- [22] SHEPPARD, M.; WERNER, W.; TSATAS, E.; MCCOY, R.; PROWSE, S.; JOHNSON, M. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. **Arch. Virol.** 143(5):915-930. 1998.
- [23] SNYDER, D.B. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. **Avian Pathol.** 19(3):419-423. 1990.
- [24] TSUKAMOTO, K.; SAITO, S.; SAEKI, S.; SATO, T.; TANIMURA, N.; ISOBE, T.; MASE, M.; IMADA, T.; YUASA, N.; YAMAGUCHI, S. Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. **J. Virol.** 76(11):5637-5645. 2002.
- [25] VINDEVOGEL, H.; GOUFFAUX, M.; MEULEMANS, G.; DUCHATEL, J.P.; HALEN, P. [Infectious bursal disease: distribution and persistence of the virus in inoculated chickens. Study on the transmission of the disease]. **Avian Pathol.** 5(1):31-38. 1976.